

Ensayos

Caracterización de cuatro aislados de viroides presentes en los cítricos de jagüey grande.

Resumen

Se desarrolló un trabajo de caracterización a cuatro aislados de viroides, relacionados con la exocortis y la cachexia de los cítricos presentes en las plantaciones de Jagüey Grande, con el objetivo de identificar las especies presentes en dichos aislados, para lograrlo se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (sPAGE). Los análisis permitieron la identificación de las siguientes especies del complejo de viroides de los cítricos: (CEVd) para el aislado DC 24; (Cvd- II) para DP 26 y DT 8, y (Cvd- III) para los aislados DC 13, DP 26 y DT 8. Después de cuatro meses de la inoculación, se corroboró que los resultados electroforéticos se corresponden con los síntomas observados en las plantas indicadoras inoculadas. Esta caracterización sienta las bases para el desarrollo de investigaciones posteriores en las que las diferentes especies sean utilizadas con fines beneficiosos y para el establecimiento de nuevas técnicas de diagnóstico.

Abstract

Work was carried out on the characterization of four isolated viroids related to exocortis and cachexia of citrus found in Jagüey Grande's plantations. The aim was to identify the species present in such isolates. To achieve this, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (sPAGE) was used. The analyses enabled us to identify the following species of the citrus viroid complex: (CEVd) for the DC 24 isolate; (Cvd - II) for DP 26 and DT 8, and (Cvd - III) for the DC 13, DP 26 and DT 8 isolates. After four months of inoculation, it was possible to corroborate that the electrophoretic results correspond to the symptoms observed in the inoculated indicator plants. This characterization establishes the bases for the development of further research in which the different species are used for beneficial purposes and for the establishment of new diagnostic techniques.

Abstrait

On a effectué un travail de caractérisation de 4 viroides isolés, liés à l'exocortis et à la cachexie des citriques présents dans les plantations de Jagüey Grande, avec pour objectif d'identifier les espèces présentes dans ces dits isolés. Pour le réussir, on a utilisé l'électrophore en gels de polyacrylamide (sPAGE).

Les analyses ont permis d'identifier les espèces suivantes du complexe de viroides des citriques : (CEVd) pour l'isolé DC 24 ; (Cvd- II) pour DP 26 et DT 8, et (Cvd- III) pour les isolés DC 13, DP 26 et DT 8. Après 4 mois d'inoculation, on a constaté que les résultats de l'électrophorèse correspondent aux symptômes observés sur les plantes indicatrices inoculées. Cette caractérisation assied les bases pour le développement de recherches postérieures afin que les différentes espèces soient utilisées à des fins bénéfiques et pour la mise en place de nouvelles techniques de diagnostic.

Palabras claves: diagnóstico, fitopatógenos, indicadora y síntomas.

- * D. Rodríguez.
- ** Karella Velásquez.
- * R. Pérez.
- ** Juana M. Pérez.

Introducción

Los viroides son los agentes fitopatógenos más pequeños y simples descritos hasta el momento, que causan enfermedades aún no curables, entre las que se destacan la exocortis y la cachexia como las más distribuidas en las plantaciones cítricas de Cuba (Batista et al., 1995; Pérez et al., 1998).

En Cuba no se han informado pérdidas considerables de los rendimientos debido a los viroides puesto que casi la totalidad de los cítricos se encuentran injertados sobre Naranja Agrio (patrón tolerante a los viroides), pero con la entrada del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y su vector más eficiente (*Toxoptera citricida*) se hace necesario la implantación de un sistema diversificado de patrones, muchos de los cuales pueden ser sensibles a dichos patógenos (Duran-Vila, 1997).

Los viroides, además de ser perjudiciales en caso de variedades sensibles y aislados severos; pueden ser utilizados con fines beneficiosos para enanizar

* Estación Experimental de Cítricos y Frutales, Jagüey Grande, Matanzas, Cuba.

** Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ciudad Habana, Cuba.

plantas, aumentando la densidad de éstas por superficie y facilitando las labores culturales y de recolección (Owens et al., 2000); pueden ser utilizados además para protección cruzada de las plantas contra otros patógenos como los hongos (García, 2002) y viroides severos como el que produce la cachexia (variante patogénica del HSVd). De ahí que este trabajo tuvo como objetivo la caracterización mediante la sPAGE y plantas indicadoras de cuatro aislados de estos fitopatógenos presentes en los árboles cítricos de Jagüey Grande, para determinar las especies con que estos cuentan y su posible uso en la citricultura.

Materiales y métodos

Se tomaron los siguientes aislados de una plantación de limero 'Persa' (Citrus latifolia tan) injertado sobre Citrus macrophylla: DC 13, DC 24, DP 26 y DT 8. los que fueron inoculados en plantas de cidro 'Etrog Arizona 861 s-1 injertadas sobre cidrón (híbrido natural de Citrus medica) (Pérez et al., 2002), mediante inserción de corteza de vástagos infectados, simultáneamente por debajo del injerto. Se dejaron plantas sin inocular como control sano.

A partir del momento en que se zafaron los naylon de los injertos, se realizaron observaciones visuales de las plantas en busca de síntomas típicos de exocortis con el objetivo de describir los mismos y determinar el período de incubación de los distintos aislados.

Para identificar la especie de los distintos viroides que pudieran aparecer en las muestras después de dos y cuatro meses de la inoculación, se tomaron brotes jóvenes (de 4 a 6g) los cuales se homogenizaron según el procedimiento empleado por Duran-Vila et al. (1986) en un medio de extracción (0.4M Tris HCl pH=8.9; 1% SDS, 5mM EDTA pH=7; 4% 2 Mercaptoethanol) y fenol saturado en agua pH=7.0, proporción 1:1:3 respectivamente. Los ácidos nucleicos (fase acuosa), se precipitaron en etanol (90-95%) y luego se fraccionaron 2M LiCl; precipitando la parte soluble en etanol, y finalmente se resuspendió en tampón 10mM Tris, 10mM KCl, 0.1mM MgCl, pH= 7.4.

A partir de estas preparaciones de ácidos nucleicos, se tomaron alícuotas de 50 µL y se sometieron a una electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida

(sPAGE) para la detección de viroides, según la metodología de Semancik y Harper (1984) y Duran-Vila et al.(1988). La primera corrida se efectuó en un gel nativo con dimensiones de 180 x 160 x 1.5 mm, en un equipo Bio-Rad, y una intensidad de corriente de 66 mA, durante 2 a 2.5 horas a 4 °C.

Después de esta corrida, el gel se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio con agitación suave durante diez minutos y posteriormente se observó bajo luz UV para cortar la tira identificada como "zona de viroides" que comprende desde la muestra standard del CEVd hasta el 7s del hospedero. Esta banda se colocó en la parte superior de un gel desnaturante de dimensiones 180 x 100 x 2.25 mm conteniendo 8M de Urea y polimerizado en TAE pH=6.5 según la técnica empleada por Rivera-Bustamante et al.(1986) con modificaciones en las dimensiones y grosor del gel a una intensidad de corriente de 22 mA (Pérez y González, 1990) durante 4 a 5 horas a temperatura ambiente, hasta que el marcador avanzó próximo al final del gel. La tinción se realizó con nitrato de plata (Igloi, 1983), para visualizar e identificar las bandas de viroides correspondientes a cada aislado analizado.

Resultados y discusión

A continuación se muestra en la tabla 1 el período de incubación para cada uno de los aislados en estudio, así como el grado de la sintomatología observada en la indicadora. se puede apreciar la marcada diferencia existente entre la variedad e intensidad de los síntomas de cada uno de ellos que serán discutidos más adelante.

TABLA.1: EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR LOS AISLADOS EN LA INDICADORA CIDRO 'ETROG ARIZONA 861 S-1' HASTA LOS CUATRO MESES DE INOCULADAS.

	EP	R.N.C	N.N.C	P.N	PA	PI
DC 13	++	+	+	++	++	6-12 sem
DP 26	-	-	-	-	-	-
DC 24	+++	+++	+++	+++	+++	5-7 sem
DT 8	++	+	+	-	-	7-13 sem
Control	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (-) sin síntomas, (+) leves, (++) moderados y (+++) severos
EP: epinastia foliar, R.N.C: rajadura del nervio central, N.N.C: necrosis del nervio central, P.N: peciolo necrosado, PA: peciolo arrugado, P.I: período de incubación.

Es notable la diferencia en cuanto al momento de aparición de los primeros síntomas, que en el caso del Dc 24 ocurre a las cinco semanas de inoculadas, a diferencia de los aislados DC 13 y DT 8 donde los síntomas aparecen una y dos semanas después respectivamente.

En las preparaciones de ácido nucleico obtenidas de muestras de tejidos de cidro, se identificaron por sPAGE las bandas de RNA (viroides) con diferente movilidad electroforética a las ocho y las 16 semanas de la inoculación, observándose que los viroides CEVd migraron más lentamente y que las bandas correspondientes a cada muestra coincidieron con la posición de CEVd standard en la zona de moléculas circulares de viroides.

También se observaron otras bandas de movilidad intermedia que se corresponden con Cvd-II y Cvd-III comprendidas entre las moléculas de CEVd y el RNA 7s del hospedero, las que se identificaron según la posición del control en el gel desnaturalizante de poliácridamida. No se visualizaron bandas en los extractos de tejidos sanos.

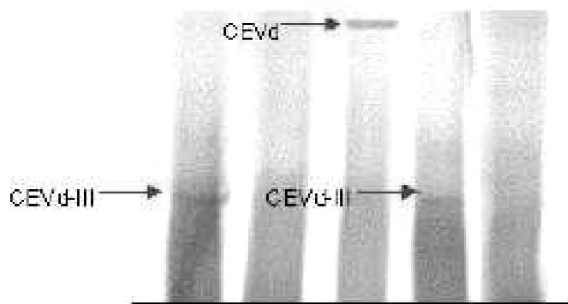


Figura 1. sPAGE con muestras de cidro a los dos meses de inoculadas.

En la Figura 1, se muestra el esquema electroforético del análisis de las muestras de cidros inoculadas con los aislados deseados, donde se destacan las bandas circulares de CEVd (~ 371 nucleótidos) procedente del aislado DC 24 lo que se corresponde con los síntomas severos de exocortis observados en cidro Etrog Arizona 861- s1 (figura 2). Se observaron además bandas de viroides situadas entre CEVd y el 7S del hospedero, correspondientes a la especie Cvd-III (~280-292 nucleótidos) para los aislados DC 13 y DT 8 causantes respectivamente de síntomas moderados y leves de exocortis en la indicadora (figura 2).

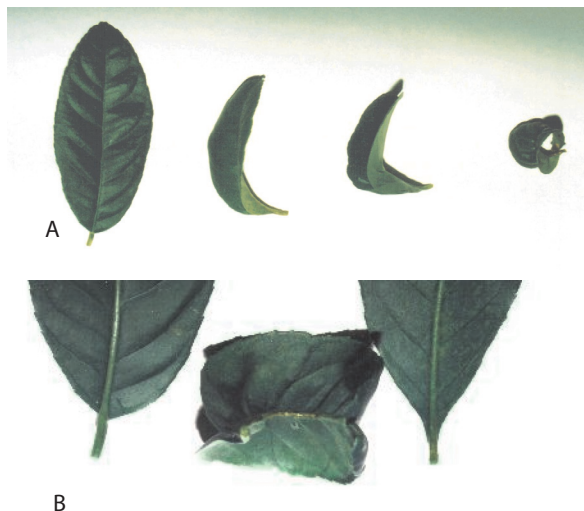


Figura 2. Síntomas inducidos por los distintos aislados en cidro 'Etrog Arizona 861s-1

A. Epinastia foliar, de izquierda a derecha: control sano, leve, moderado y severo.

B. De izquierda a derecha: Control sano, necrosis severa del peciolo y peciolo oscuro y necrótico.

Es importante destacar que el aislado DP 26 no presentó ninguna banda correspondiente a los viroides al cabo de los dos meses de la inoculación, esto no es indicativo de la no existencia de ninguno de los viroides en las plantas inoculadas, Duran-Vila (1997) planteó la aparición de las bandas de las especies de viroides leves a temperaturas entre 28 - 30 °C y durante el tiempo que duró el experimento (invierno), las temperaturas se mantuvieron por debajo de este rango (T. media de 20 a 25 °C). Por otra parte, la literatura plantea que para el caso de los viroides Cvd-II y Cvd-IV, las bandas no suelen aparecer hasta los seis meses después de la inoculación (Duran-Vila y et al.,1993).

En la corrida electroforética que se realizó a los cuatro meses, se pudo observar que al igual que la anterior, aparecieron bandas correspondientes al CEVd para el aislado DC 24 y las correspondientes a la especie Cvd-III para los mismos aislados que el caso anterior, pero difiere de este en que a los cuatro meses de la inoculación, aparece una banda en la zona standard de Cvd-II para el DT 8 y una en la zona del Cvd-III en la corrida del DP 26 que no habían aparecido anteriormente.

En este resultado influyó la temperatura que aunque no se encontraba aún en el rango óptimo de replicación

de los viroides, al cabo de este tiempo, estas habían tenido un ligero aumento y unido a esto le influyó positivamente el tiempo transcurrido entre una corrida y la otra (Duran-Vila et al., 1993).

En relación con las evaluaciones realizadas sobre la sintomatología en cidro causada por el aislado DC 24 que contiene el CEVd, así como el DC 13 y el DP 26 y DT 8 con el CVd-III, es necesario señalar que los mismos se encontraron en forma natural e independiente en especies cítricas y que esta descripción en la que se establece la unión entre el aislado y su agente causal en cidro, coincide con los informes de Duran-Vila et al. (1988).

Es de destacar que el aislado DT 8, constituido por una mezcla de viroides débiles indujo síntomas moderados en los cidros inoculados, lo cual se atribuye a un efecto de sinergismo entre los distintos viroides, planteado por Duran-Vila et al. (1988) quienes refieren que las mezclas de viroides, aún siendo de los grupos CVds, considerados viroides débiles, pueden inducir síntomas de moderados a severos, semejantes a aquellos inducidos por el CEVd. Almeida-León et al. (1999) Detectaron que en la mayoría de los casos se encuentran formando combinaciones de diferentes especies en los hospederos de campo.

Aunque hasta el momento los estudios en el país, muestran la ausencia de viroides CVd-I, estos ya se han detectado en otros países. (Semancik y Duran-Vila, 1991), no se puede negar la posibilidad de que se puedan detectar en otros aislados no analizados, o que su concentración haya estado muy baja y sea necesario utilizar métodos más sensibles y específicos.

Conclusiones

La caracterización molecular por sPAGE indicó que los aislados estudiados son portadores de los viroides CEVd (DC 24); CVd-II (DT 8); CV d-III (DC 13, DP 26 y DT 8).

- Las especies detectadas coinciden con las detectadas hasta el momento en Cuba por otros autores.
- La especie CVd -II (HSVd) no fue detectada mediante sPAGE hasta los cuatro meses de la inoculación en cidro.

Recomendación

- Se deben analizar estos y otros aislados presentes en Cuba, con el empleo de métodos más sensibles (NACH y SSCP) que permitan determinar si existen otras especies de estos patógenos a bajas concentraciones **T**

Bibliografía

- ALMEIDA-LEÓN, IM., J. JASSO-ARGUMEDO, S. CURTI-DÍAZ Y MA. ROCHA-PEÑA.
- 1999 Reexaminación de viroides asociados a la Lima Persa en México. X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México, p: 278.
- BATISTA, LOCHY; DELIA N. PORRAS; ADIRÉN GUTIERREZ; INÉS PEÑA; JOSEFINA RODRIGUEZ; O. FERNÁNDEZ, R. PÉREZ Y J.L. MORERA.
- 1995 Tristeza and Toxoptera citricida in Cuba: Incidence and control strategy. Proc. 3rd Intern. Workshop; on CTV-TC. P. 197-199, Florida, USA.
- DURAN-VILA, NURIA.
- 1997 La problemática de los viroides (exocortis y xyloporosis) en las nuevas plantaciones de cítricos. Levante Agrícola, Año XXVI 341: 330-338.
- DURAN-VILA, NURIA; J. PINA AND L. NAVARRO.
- 1993 Improved indexing of Citrus viroids. Proc 12th conf. IOCV. New Delhi, India p. 202-211.
- DURAN-VILA, NURIA; C.N. ROISTACHER; R. RIVERA-BUSTAMANTE AND J.S. SEMANCIK.
- 1988 A Definition of citrus viroid group and their relationship to the exocortis Disease. J. Gen. Virology. 69: 3069-3080.
- DURAN-VILA, NURIA; R. FLORES AND J.S. SEMANCIK.
- 1986 Characterization of Viroid-Like RNA associated with the citrus Exocortis Syndrome. Virology 150: 75-84.
- GARCÍA, ALINA.
- 2002 Incidencia de la Pudrición del pie en los cítricos de Jagüey Grande y alternativas para su control. Tesis presentada en opción al Título de Master en Citricultura Tropical. IIFT, Cuba 49 pp.
- OWENS, SA., SM. THOMPSON, AND SM. GARNSEY.
- 2000 Molecular strategies for Improving Citrus Viroids Dwarfing Agents. Congress of International Society of Citriculture. Program and abstract. Orlando, Florida p: 94-95.

- PÉREZ, JUANA MARÍA Y A, GONZÁLEZ.
 1990 Diagnóstico y caracterización de viroides de la exocortis de los cítricos. Metodología. IICF. Cuba.
- PÉREZ, JUANA MARÍA; I, PEÑA Y R, PÉREZ.
 1998 Detection of viroids in citrus of diferents ages at two times of the year. Programe and abstracts. Conf 14th of IOCV sept 13-18. Campinas Sp Brasil.
- PÉREZ, R., D. RODRÍGUEZ, JUANA MARÍA PÉREZ, KARELIA VELÁZQUEZ Y LUIS BELLO.
 2002 Susceptibilidad del Cidrón (híbrido natural de Citrus medica L) ante la cachexia de los cítricos. I Simposio Internacional sobre vigilancia fitosanitaria y su relación con la protección al entorno, Ciudad de la Habana. P: 171-172.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R; F, GIN AND J.S, SEMANCIK.
 1986 Enhanced Resolution of circular and linear molecular form of viroid like RNA by Electrophoresis in a discontinuos pH. System. Analitical Biochemistry. 156: 91-95.
- SEMANCIK, J.S Y K.L, HARPER.
 1984 Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of Specificity of RNA polymerase activity. Proc. Natl. Sci .Usa. 81: 4429-4433.
- SEMANCIK, J.S., AND NURIA DURAN-VILA.
 1991 The Grouping of Citrus Viroids: Additional Physical and Biological Determinants and Relationships with Diseases of Citrus. Proc. 11th Conf. I.O.C.V., Riverside: 178-188.

